



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	乙第1908号
学位記番号	論第1669号
氏名	小田中 瑞夕
授与年月日	令和3年3月24日
学位論文の題名	<p>Proenkephalin+ regulatory T cells expanded by ultraviolet-B exposure maintain skin homeostasis with a healing function （紫外線で増殖したプロエンケファリン+制御性 T 細胞はヒーリング機能を持ち、皮膚の恒常性を維持する）</p> <p>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 117 (34) 20696-20705, 2020</p>
論文審査担当者	<p>主査： 飯田 真介 副査： 稲垣 宏，加藤 洋一</p>

紫外線には免疫抑制作用があることが知られている。紫外線が持つ免疫抑制作用は、乾癬やアトピー性皮膚炎などの皮膚免疫疾患の治療に有効であり、紫外線療法として皮膚科診療において汎用されている。一方、制御性 T 細胞（英 regulatory T cell, Treg）は免疫学的自己寛容の維持や、過剰に起こる様々な免疫応答を抑制する役割を担っている免疫細胞である。皮膚における Treg は、定常状態においては CD4 陽性 T 細胞中の 10% ほどの割合を占めるが、紫外線(UVB)照射によって約 5 倍に増加することが明らかとなった(Yamazaki et al., J Immunol 2014)。そこで本研究では、紫外線照射によって皮膚で増えた Treg (UVB-skin Treg) の特徴と機能の解析を行うこととした。

まず UVB-skin Treg の T Cell Receptor (TCR)レパトア解析を行ったところ、UVB-skin Treg に特徴的な TCR がクローナリーに増えていることがわかった。また、このクローナリーに増えている UVB-skin Treg の TCR は他のグループから報告されている組織 Treg が持つ TCR とは異なり、ユニークな TCR であることもわかった。

次に、RNA-Sequencing 解析を行ったところ、UVB-skin Treg は内因性オピオイドの前駆体であるプロエンケファリンなど他の組織 Treg とは異なったユニークな遺伝子セットが高発現していることがわかった。また、他の組織 Treg と共通な遺伝子として上皮成長因子受容体リガンドであるアンフィレグリンが高発現していることもわかった。Flow Cytometric 解析を行ったところ、これらのプロエンケファリン (PENK) やアンフィレグリン (AREG) は UVB-skin Treg の細胞内でタンパクレベルでも発現していることが確認できた。

PENK 由来の神経ペプチドであるメチオニンエンケファリン (Met-ENK) や AREG は修復に寄与するとの報告があることから、次に、Met-ENK と AREG がケラチノサイトに直接的に影響を及ぼすかどうかを確かめるため、Skin explant assay を行ったところ、Met-ENK と AREG を加えた群では有意にケラチノサイトの伸長が確認できた。また、skin explant に CD25^{high} Treg を加えた群は、加えない群に比べて有意にケラチノサイトの伸長が見られたが、CD25^{high} Treg を加えた群に δ オピオイド受容体のアンタゴニストである Naltrindole や抗 AREG 中和抗体を加えると、ケラチノサイトの伸長の有意な差は見られなくなった。これらの結果より、紫外線照射によって、Treg は PENK や AREG を産生し、ケラチノサイトの伸長を促進することから、UVB-skin Treg は治癒機能を有しているのではないかと考えられた。また、遺伝子発現解析の結果から、UVB-skin Treg はケラチノサイト増殖や、創傷治癒に関わる血管新生、ケモタキシス、細胞外マトリックス形成などに関連する遺伝子が高発現していた。更に、Gene Ontology (GO)解析の結果からも“wound healing involved in inflammatory responses”に有意にエンリッチしていることがわかった。また、“negative regulation of IFN- γ production”や“negative regulation of inflammatory response”にも有意にエンリッチしており、紫外線照射によって起こる皮膚の炎症を抑制していることもわかった。これらの結果から、UVB-skin Treg は紫外線照射によって起こる皮膚の炎症を抑制し、創傷治癒関連遺伝子が高発現することによって、PENK および AREG の産生を通じて、治癒を促進する可能性があることが示唆された。

最後に、マウスの創傷治癒モデルを用いて、紫外線照射自体が皮膚創傷治癒を促進するかどうかを調べた。紫外線照射したマウスと照射していないマウスの背部に創傷を作り、治癒の割合を測定したところ、紫外線照射したマウスでは有意に治癒していた。また、Treg を選択的に除去することのできる遺伝子改変マウスである *Foxp3^{DTR}* マウスを用いて、ジフテリアトキシン投与により Treg を欠失させ、同様の創傷治癒実験を行ったところ、創傷治癒の促進効果は消失して

いた。このことから、UVB-skin Treg は、紫外線照射したマウスの創傷治癒を促進する上で重要な役割を果たすことが示唆された。

以上のことから、紫外線によって皮膚で増える制御性 T 細胞は創傷治癒を亢進する機能を有し、皮膚の恒常性を保つ役目を担っていることがわかった。

論文審査の結果の要旨

【申請された論文の要旨】 これまで申請者らのグループは、紫外線(UVB)照射によって皮膚の制御性 T 細胞 (Treg) が定常時の約 5 倍に増えることを見いだした(Yamazaki et al., J Immunol.,2014)。しかし、紫外線照射をした皮膚で増える制御性 T 細胞 (UVB-skin Treg) の生理学的な特徴や機能は不明であったため、本論文では UVB-skin Treg の特徴と機能の解析を行った。UVB-skin Treg は UVB 照射した皮膚で樹状細胞により抗原提示をされて増えるが、T 細胞レセプター (TCR) レパトア解析により、UVB-skin Treg がクローナルに増え、ユニークな TCR レパトアであることが示唆された。また、RNA-seq 解析の結果、Foxp3 や CTLA4 などの Treg-signature 遺伝子群のみでなく、UVB-skin Treg に高発現している複数の遺伝子群が見出された。その中で、内因性オピオイドの前駆体プロエンケファリン (PENK) と上皮成長因子受容体リガンドのアンフィレグリン (AREG) がコントロールに比し、最も高発現かつ高変動であることがわかった。タンパクレベルの発現解析のため、フローサイトメトリーを行ったところ、紫外線照射をしていないマウスの皮膚 Treg と比較して、UVB-skin Treg は PENK や AREG を有意に高発現していた。Gene Ontology 解析を行った結果、UVB-skin Treg が創傷治癒に関連する経路にエンリッチしているというデータが得られた。UVB-skin Treg が創傷治癒の促進効果をもっていることを検討するため、*ex vivo* の skin explant assay と *in vivo* の wound healing assay を行った。Skin explant assay で UVB 照射マウスの Treg はケラチノサイトの伸長を有意に促進し、その効果は PENK の誘導体である Met-ENK の特異的阻害剤や AREG の中和抗体で消失した。さらに、wound healing assay において UVB 照射で創傷治癒が促進されることがわかり、Treg を特異的に欠損できる遺伝子組換えマウス (Foxp3-DTR) を使うことで、その促進効果が Treg によることも示した。これらの結果から、UVB-skin Treg は、PENK や AREG を産生し、皮膚の治癒機能を高めることが示唆された。

【審査の内容】 申請者より論文の内容が発表された後、第一副査の稲垣教授より、Treg の種類及び機能的に異なる Treg はどれくらい知られているのか、その中での UVB-skin Treg の位置づけ、骨格筋の Treg の分子的特徴と UVB-skin Treg との違い、組織の Treg が誘導されるメカニズム、UVB 照射による組織やケラチノサイトのダメージと炎症の関連性、UVB-skin Treg のオリジン、Treg のマスター遺伝子である Foxp3 は機能が多いが、なぜ Treg のマスター遺伝子となるのか、UVB-skin Treg と比較する際に用いたリンパ節 Treg の場所はどこか、など 9 項目について質問があった。次に、第二副査の加藤教授より、Treg を CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ で定義した理由と、このマーカーが他の組織でも共通かどうかについて、Treg と TCR レパトア解析や RNA-seq 解析を比較する際に Tconv は単一の集団ではないようだが、比較対照として適当であるのかどうか、PENK や AREG 発現誘導のメカニズムについて、 δ オピオイド受容体を介したケラチノサイト伸長のメカニズムについて、UVB-skin Treg が他の組織 Treg とは違った特徴的な機能を持つようになる理由について、など 6 項目について質問があった。最後に、主査の飯田教授より、UVB 照射による Treg の expansion が起こる場所は、局所的か皮膚全体か、Treg の expansion は皮膚のランゲルハンス細胞がリンパ節に遊走し、そこで抗原提示をして増えた Treg が戻ってくるというメカニズムが通常のように思うが、UVB-skin Treg の expansion はそれとは異なるのか、UVB 照射で生じるどの DAMPs が抗原となるのかについて、皮膚からの Treg の単離方法について、ヒトの皮膚でもマウスと同様の応答が起こるのかについて、UVB-skin Treg のマーカーの特徴と Treg 全般で共通する活性化マーカーの存在について、臨床応用への可能性について、など 9 項目の質問があった。これらの質問に対し、申請者からはおおむね満足できる回答が得られた。本論文は紫外線照射によって皮膚で増えたプロエンケファリン陽性制御性 T 細胞が治癒機能を高めることを示した論文であり、免疫学的に意義があると考えられた。よって本論文の筆者には、博士(医学)の称号を与えるにふさわしいと判断した。

論文審査担当者 主査 飯田 真介

副査 稲垣 宏、加藤 洋一